



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2003-0024656  
Application Number

출 원 년 월 일 : 2003년 04월 18일  
Date of Application APR 18, 2003

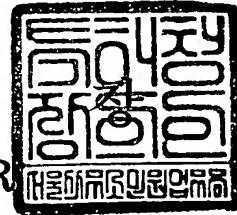
출 원 인 : 한국생명공학연구원  
Applicant(s) Korea Research Institute of Bioscience and Biotech



2003 년 12 월 30 일

특 허 청

COMMISSIONER



## 【서지사항】

【서류명】 서지사항 보정서  
 【수신처】 특허청장  
 【제출일자】 2003.04.28  
 【제출인】

【명칭】 한국생명공학연구원  
 【출원인코드】 3-1999-034166-5  
 【사건과의 관계】 출원인

【대리인】  
 【성명】 허상훈  
 【대리인코드】 9-1998-000602-6  
 【포괄위임등록번호】 2002-063992-2

【사건의 표시】  
 【출원번호】 10-2003-0024656  
 【출원일자】 2003.04.18  
 【심사청구일자】 2003.04.18  
 【발명의 명칭】 groEL2 유전자를 이용한 스트렙토미세스 속 균종의  
 동정방법

【제출원인】  
 【접수번호】 1-1-03-0137524-87  
 【접수일자】 2003.04.18  
 【보정할 서류】 특허출원서  
 【보정할 사항】

【보정대상항목】 발명자  
 【보정방법】 정정  
 【보정내용】  
 【발명자】  
 【성명의 국문표기】 김범준  
 【성명의 영문표기】 KIM, Bum-Joon  
 【주민등록번호】 681008-1042511  
 【우편번호】 122-802  
 【주소】 서울특별시 은평구 갈현2동 227-34호  
 【국적】 KR

## 【발명자】

【성명의 국문표기】	김창진
【성명의 영문표기】	KIM, Chang-Jin
【주민등록번호】	550828-1067921
【우편번호】	305-340
【주소】	대전광역시 유성구 도룡동 391 타운하우스 7동 203 호
【국적】	KR

## 【발명자】

【성명의 국문표기】	고영환
【성명의 영문표기】	KO, Young Hwan
【주민등록번호】	570805-1047711
【우편번호】	690-121
【주소】	제주도 제주시 아라1동 1709-1 염광아파트 9-403
【국적】	KR

## 【취지】

특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인  
허상훈 (인)

## 【수수료】

【보정료】	0 원
【기타 수수료】	0 원
【합계】	0 원
【첨부서류】	1. 기타첨부서류[확인서]_1통

## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.04.18
【발명의 명칭】	g r o E L 2 유전자를 이용한 스트렙토미세스 속 균종의 동정 방법
【발명의 영문명칭】	Identification method of genus Streptomyces by using groEL2 gene
【출원인】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【출원인코드】	3-1999-034166-5
【대리인】	
【성명】	허상훈
【대리인코드】	9-1998-000602-6
【포괄위임등록번호】	2002-063992-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김창진
【성명의 영문표기】	KIM, Chang-Jin
【주민등록번호】	550828-1067921
【우편번호】	305-340
【주소】	대전광역시 유성구 도룡동 391 타운하우스 7동 203호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김범준
【성명의 영문표기】	KIM, Bum-Joon
【주민등록번호】	681008-1042511
【우편번호】	122-802
【주소】	서울특별시 은평구 갈현2동 227-34호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	고영환
【성명의 영문표기】	KO, Young Hwan
【주민등록번호】	570805-1047711

【우편번호】 690-121  
【주소】 제주도 제주시 아라1동 1709-1 염광아파트 9-403  
【국적】 KR  
【심사청구】 청구  
【핵산영기 및 아미노산 서열목록】  
【서열개수】 42  
【서열목록의 전자파일】 첨부  
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 허상훈 (인)  
【수수료】  
【기본출원료】 20 면 29,000 원  
【가산출원료】 75 면 75,000 원  
【우선권주장료】 0 건 0 원  
【심사청구료】 7 항 333,000 원  
【합계】 437,000 원  
【감면사유】 정부출연연구기관  
【감면후 수수료】 218,500 원  
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)\_1통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 groEL2 유전자를 이용한 스트렙토미세스 속 균종의 동정방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 모든 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머를 제조하고, 이를 이용하여 groEL2 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 기존의 형태학적 분류법이 갖는 시간, 정확성의 문제점을 해소하며, 또한 요즘 일반적으로 사용되고 있는 16S rDNA 동정법의 갖는 시간, 비용상의 문제점을 해결하여 간편하고, 경제적이며 정확성이 높은 동정법을 제공함으로써 향후 스트렙토미세스 속 균종의 동정에 널리 이용될 수 있다.

**【대표도】**

도 5

**【색인어】**

groEL2 유전자, 특이적' 프라이머

### 【명세서】

#### 【발명의 명칭】

g r o E L 2 유전자를 이용한 스트렙토미세스 속 균종의 동정방법{Identification method of genus Streptomyces by using groEL2 gene}

#### 【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 사용한 groEL2 유전자 분절 및 프라이머 위치를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 스트렙토미세스 속 특이적 프라이머를 이용한 표준균주 DNA의 648-bp groEL2 유전자 분절 증폭산물을 전기영동 사진으로 나타낸 것이다.

도 3은 groEL2 420-bp 염기서열로 완성된 표준균주 40주의 계통도를 나타낸 것이다.

도 4는 유도 아미노산 140개로 완성된 표준균주 40주의 계통도를 나타낸 것이다.

도 5는 groEL2 420-bp 분절을 이용하여 비교염기서열 분석법에 의한 5주 비표준균주의 동정 결과를 나타낸 것이다.

#### 【발명의 상세한 설명】

#### 【발명의 목적】

#### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<6> 본 발명은 groEL2 유전자를 이용한 스트렙토미세스 속 균종의 동정방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 모든 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머를 제조하고, 이를 이용하여 groEL2 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이

터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 방법에 관한 것이다.

<7> 천연물질의 분리, 동정에 대한 집중적인 연구와 기술의 발전에 의하여 현재 미생물에서 분리된 항생물질이 10,000여 종으로 큰 부분을 차지하고 있다. 또한, 새로운 연구방법과 기술의 계속적인 발전, 새로운 분리원의 발견 그리고, 미생물 대사산물의 수의학과 농업에의 적용 등으로 미생물을 이용한 항생물질의 개발에 지속적으로 기여하여 왔다.

<8> 일반적으로 항생물질은 Tyndall에 의해서 미생물 상호간의 길항작용이 관찰된 후 1929년 Fleming에 의해 발견된 페니실린(penicillin)을 기초로 하여 Waksman과 Woodruff(1940)가 스트렙토미세스 안티바이오틱스(*S. antibioticus*)에서 액티노마이신(actinomycin)을 분리하고, Schatz와 Wakman(1944)이 스트렙토미세스 그리세어스(*S. griseus*)에서 스트렙토마이신(streptomycin)을 분리하여 폐결핵의 치료약으로 사용하면서 스트렙토미세스 속 균종은 항생물질의 생산균으로서 산업적으로나 의학적으로 중요한 미생물로 다루어지게 되었다. 스트렙토미세스 속 균종은 2차 대사산물의 다양성으로 인하여 생리활성 물질의 종류도 다양하다. 지금까지 미생물로부터 탐색된 10,000여 종의 생리활성 물질 가운데 약 2/3 정도가 스트렙토미세스 속 균종으로부터 발견되었을 정도로 각종 생리활성물질의 탐색에 있어서 이들이 차지하는 비중은 매우 크다. 이러한 이유 때문에 생물소재산업에 있어서 산업적으로 가장 중요한 미생물 군으로 부각되고 있다.

<9> 미생물 중에서 스트렙토미세스 속 균은 그 종(species)이 세균 중에서 가장 다양할 뿐만 아니라, 같은 종 내에서도 서로 다른 생리대사능력을 보유하고 있다[ Anderson AS, Wellington EM. The taxonomy of Streptomyces and related genera. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001, 51(3):797-814]. 따라서, 많은 종류의 생리활성물질이 방선균의 대사산물로부터 개

발되고 있으며, 농수산업(육종, 병충해 방제 등), 환경산업(폐기물 분해처리), 정밀화학산업(공업화학약품), 식품산업(원료, 첨가제 등), 반도체산업(biosensor), 그리고 의약업 등에서 활용될 수 있는 잠재력도 크다. 천연물을 각종 질병의 예방, 완화 또는 치료의 목적으로 이용하고자 하는 연구가 근래에 들어 적극적으로 이루어져 오고 있다[1. Emmert EA, Handelsman J. Biocontrol of plant disease: a (gram-) positive perspective. FEMS Microbiol. Lett. 1999, 1;171(1):1-9, 2. Nielsen J. Metabolic engineering: techniques for analysis of targets for genetic manipulations. Biotechnol. Bioeng. 1998;58(2-3):125-32, 3. Hutchinson C, Colombo A. Genetic engineering of doxorubicin production in *Streptomyces peucetius*: J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1999, Jul;23(1):647-652]. 이러한 목적에 접근하는 방법 중에 하나는 다양한 생물자원을 확보하는 것이다. 생물체 중에서도 생리적 다양성, 산업화 가능성 등을 고려할 때, 스트렙토미세스 속균의 활용분야가 매우 큰 부분을 차지하고 있다.

<10> 생물학적 다양성에 관한 국제협약은 생물다양성의 보존과 지속 가능한 이용 그리고, 유전자원을 이용하여 얻은 이익의 공정분배에 관한 것으로, 세계 각국의 생물자원 보존에 관심을 가지고 있다. 자연환경의 오염 정도가 점차 심각해지고 있는 실정에서 국내의 미생물 자원을 확보, 보존하는 작업이 시급함을 알 수 있다. 미생물자원의 수집, 보존 필요성을 더욱 강조하는 측면에서 본다면, 1980년도부터 미국은 미생물에 대한 특허권을 인정하고 있으며, 국내에서도 1987년도부터 미생물이 특허의 대상이 되고 있다.

<11> 미생물에 대한 특허권을 확보하는 데에는 물론 그 미생물이 생산하는 특이적인 생리활성 물질도 중요하지만, 그 미생물의 정확한 계통 발생학적인 위치(혹은 분류) 또한 중요하다.

<12> 현재의 스트렙토미세스 속 균종에 의한 새로운 물질의 스크리닝은 물질 위주로 수행되기 때문에 기존의 특허물질과 중복되는 경우가 상당히 많다. 따라서, 이러한 신물질 탐색방법은 이 방선균의 분류 동정에 의해 새로운 종이나 새로운 균주(strain)가 결정된 후에 수행되어야 확률적으로 다양한 신물질을 획득할 가능성이 높다고 할 수 있다. 일반적으로 요즘은 스트렙토미세스 속 균종의 분류는 기존의 표현형적(phenotypic) 특성에 따라 생리학적, 형태학적 혹은 생화학적 특성을 통한 수치 분류법(numerical taxonomy)에 기초하고 있다.

<13> 그러나, 상기 수치 분류법(numerical taxonomy)은 너무 많은 스트렙토미세스 균종과 균성장속도의 느림(대장균의 분열주기 : 20분, 스트렙토미세스: 2-3 시간) 때문에 확실하게 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 데 있어서 시간상의 문제 뿐만 아니라 정확성에 있어서 문제점이 보고되고 있다.

<14> 이러한 기존 방법의 문제점 때문에, 요즘은 모든 세균의 계통적 관계를 잘 나타내는 표준시계분자(chronometer molecule)를 염기서열 분석방법으로 분석하여 종을 결정하는 분자분류학(molecular taxonomy)방법으로 동정하는 추세이다. 이런 표준시계분자(chronometer molecule)로서 가장 널리 균 동정에 이용되고 있는 것은 16S rDNA 분자이다. 그리고, 현재 스트렙토미세스 속 균종의 동정에도 가장 널리 이용되고 있다.

<15> 물론 16S rDNA의 염기서열 결정에 의한 균 동정방법은 현재 기존의 표현형적(phenotypic) 특성을 이용한 수치분류법을 대신하여 가장 널리 이용되고 있다. 현재 병원성균을 비롯한 중요한 균들을 분자생물학적인 방법으로 검출하는 장비(kit)의 표적으로서 16S rDNA 염기서열이 가장 널리 사용되고 있다(미코박테리아균 판별을 위한 유전자 탐침장비 등).

<16> 그러나, 이러한 16S rDNA는 여러 가지 단점을 가지고 있다. 첫 번째로, 염기서열 분석에 의한 비교염기서열 분석방법으로 균을 동정하기 위해서는 비록 염기서열 변이가 심한 과

변이부위(hypervariable region)가 존재하지만, 정확한 균 동정을 위해서는 전체 1.5 kbp의 염기서열을 분석해야 되기 때문에 시간상 또한 비용상으로 크게 문제가 된다. 이런 단점은 앞으로 DNA 칩에 의한 동정 방법을 개발하는데 있어서 너무나 많은 소중합체 올리고며 (oligomer)를 사용해야 한다는 문제점이 있다. 두 번째로, 스트랩토미세스 속과 같이 450 종 이상이 되는 많은 데이터(data)를 분석하기 위해서는 매우 많은 비용이 필요하다. 따라서, 현재 다른 균종들의 16S rDNA의 데이터 베이스(data base)는 현재 유전자은행(Genbank)상에 확실히 확립되어 있지만, 스트랩토미세스 속 균종은 일부 균종을 제외하고는 전체 균종의 데이터(data)가 아직까지 완벽하게 확립되어 있지 않다. 세 번째로, 16S rDNA에 의한 분류 방법의 가장 치명적인 약점으로는 어떤 균종에서는 이들이 전체 염색체 상에서 이중복사 유전자(multi-copy gene)로 존재하고 또한 이렇게 존재하는 대립유전자(allele)의 염기서열이 서로 다른 염기서열로 존재하고 있다는 보고가 있다[Ueda K, Seki T, Kudo T, Yoshida T, Kataoka M. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. J. Bacteriol. 1999, Jan;181(1):78-82]. 즉 한 균주에서 여러 16S rDNA의 염기서열이 존재한다는 것이다. 이러한 사실은 염기서열 분석상에서 기술적으로 상당한 문제점으로 작용한다. 따라서, 방선균의 표적유전자를 중합효소 연쇄반응으로 증폭시킨 후에 이 산물을 직접적으로 염기서열 분석을 하지 못하고, 반드시 벡터에 클로닝시킨 후 여러 클론을 염기서열분석 해야 한다는 문제점이 있다.

<17> 이러한 문제점 때문에 16S rDNA 이외에 방선균의 동정에 이용될 대체 표준시계분자 (chronometer molecule)의 선택이 필요하다.

### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<18> 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 연구한 결과, 모든 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머를 제조하고, 이를 이용하여 groEL2 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

<19> 따라서, 본 발명은 모든 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머 및 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자 분절을 제공하는데 그 목적이 있다.

<20> 또한, 본 발명은 상기 프라이머로 groEL2 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 방법을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

### 【발명의 구성 및 작용】

<21> 본 발명은 모든 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머 및 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자 분절을 그 특징으로 한다.

<22> 또한, 상기 프라이머로 groEL2 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 방법을 또 다른 특징으로 한다.

<23> 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

<24> 본 발명은 모든 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머를 제조하고, 이를 이용하여 groEL2 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 방법에 관한 것이다.

<25> 스트렙토미세스 속 균종을 분류 동정하는데 있어서의 16S rDNA를 대체할 수 있는 대체분자로서 본 발명에서는 GROEL2 단백질을 코딩하는 groEL2 유전자 분절을 사용한다. 상기 유전자는 세균의 스트레스(stress)에 관여하는 단백질을 코딩하고 이 단백질은 세균뿐만 아니라 심지어 인간에게까지 그 기능이 보존된다. 따라서, 유전자 변이가 외부 선택압에 의해 일어난다기 보다는 시간과 관련된 무작위적 변화를 보여주는 표준시계분자(chronometer molecule)로 간주할 수 있다. 즉, groEL2 유전자의 염기서열은 세균간의 계통학적 관계를 잘 나타낼 것으로 생각된다.

<26> 기존의 표준시계분자로 널리 사용되던 16S rDNA와 비교하여 본 발명의 groEL2 유전자 분절은 다음과 같은 장점이 있다.

<27> 1. 16S rDNA를 표적으로 하여 비교염기서열 분석 방법에 의하여 정확한 균 동정을 하기 위해서는 거의 1.5 kbp 정도의 전체 유전자를 분석해야 한다.

<28> 그러나, groEL2 유전자는 단지 420-bp 혹은 423-bp의 염기서열 분석만으로도 정확한 균 동정이 가능하다. 이러한 차이는 동정에 있어서의 비용을 몇 배 절약할 수 있다는 이점이 있다.

<29> 2. 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 데 있어서 16S rDNA 분석 방법의 가장 큰 단점은 어느 종에 있어서 한 개체에 이 유전자가 다중복사(multy-copy)로 존재하고, 또한 이들의 염기

서열이 서로 다르기 때문에, 이 종을 분석하는데 있어서는 직접 염기서열 분석방법으로 분석할 수 없다는 문제점이 있다. 이런 경우에는 클로닝 작업 후에 여러 클론을 염기서열분석 해야 한다. 따라서 직접 염기서열 분석방법에 비해 노동력과 시간 및 비용이 몇 배가 소모된다.

<30> 그러나, groEL2 유전자는 한 개체에 단일한 염기서열만을 갖는 것으로 보고되고 있기 때문에 이러한 단점을 보완할 수 있다.

<31> 3. 16S rDNA는 과변이 부위의 염기서열 길이가 서로 다르다. 즉 염기서열 정렬(alignment)상에서 끊어진 곳(gap)이 존재한다.

<32> 그러나, 본 연구에서 표적으로 사용할 groEL2 분절은 몇 개 종을 제외한 거의 모든 스트렙토미세스 균종이 같은 크기의 염기서열 즉 420-bp만을 가지고 있다. 예외인 균주들도 단지 1개의 아미노산, 즉 3-bp만이 첨가되어 있기 때문에 423-bp의 염기서열을 가지고 있을 뿐이다. 따라서, 이러한 특성은 염기서열 정렬(alignment)이나 염기서열을 결정하는 데 있어서 상당한 장점으로 작용한다.

<33> 4. 16S rDNA는 구조유전자이기 때문에 아미노산을 코딩하지 않는다. 따라서, 이 유전자를 이용한 동정방법이 유도된 아미노산을 동정에 이용하지 못하는 반면에, 기능유전자인 groEL2 유전자는 아미노산을 코딩하므로 염기서열 뿐만 아니라 유도된 아미노산도 균 분류에 이용될 수 있다.

<34> 5. 16S rDNA에 의한 스트렙토미세스 속 균종의 염기서열 데이터베이스는 1980년 중반부터 수행되어 왔고, 산발적으로 여러 다른 연구자에 의해 수행되어 왔기 때문에 독자적인 데이터베이스를 구축하는 데에는 문제가 많다.

<35> 그러나, 본 발명에서 수행된 groEL2 염기서열은 진뱅크(Genbank) 상에서 전부 새로운 것으로 확인되었기 때문에 독자적인 스트렙토미세스 분류용 데이터베이스 구축에 유리할 것으로 사료된다.

<36> 또한, 이미 공지된 특허공개번호 제2003-15124호에 사용된 rpoB 유전자 보다 본 발명의 groEL2 유전자는 스트렙토미세스 속에 속하는 두 종간의 염기서열 변이 및 유도 아미노산 변이가 rpoB 유전자보다 크다는 장점이 있어 분류 및 진단에 이용되는 시계표준분자로서 더욱 유리하다.

<37> 이와 같은 groEL2 유전자를 이용한 스트렙토미세스 속 균종의 동정방법을 상세히 설명하면 다음과 같다.

<38> 본 발명은

<39> 1) 스트렙토미세스 속 균주의 groEL2 유전자 분절을 특이적으로 증폭시키는 프라이머를 이용하여 목적 균주의 groEL2 유전자 분절을 증폭하는 단계;

<40> 2) 상기 증폭된 groEL2 유전자 분절의 염기서열을 분석하는 단계; 및

<41> 3) 상기에서 분석된 염기서열과 표준 균주의 groEL2 유전자 분절의 염기서열을 비교하는 단계를 포함하는 스트렙토미세스 속 균종의 동정방법에 그 특징이 있다.

<42> 상기 1) 단계에서 groEL2 유전자 분절을 증폭시키기 위하여 스트렙토미세스 속에 특이적인 프라이머를 제조하는 데 있어, 현재 전체 groEL2 염기서열이 보고된 스트렙토미세스 리비단스(*S. lividans*)와 스트렙토미세스 알버스(*S. albus*)의 염기서열 및 스트렙토미세스와 계통분류학적으로 밀접한 슈카무렐라 파우로메타볼라(*T. paurometabola*)의 염기서열과 비교하여 가장 염기서열이 잘 보존된 부위를 각각 정방향, 역방향 프라이머로 선정한다. 그 이후에 본

발명에서 분석하고자 하는 스트렙토미세스 표준균주 40종의 DNA를 대상으로 하여 제조된 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄반응이 모든 균종에서 648-bp의 증폭산물을 생산하는지를 확인한다.

<43> 바람직한 프라이머로는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 것이다.

<44> 상기 스트렙토미세스 속 균주에 특이적인 프라이머를 이용하여 목적 균주의 groEL2 유전자 분절을 PCR 기법으로 증폭하여 염기서열을 분석한다. 이 때, 표준 균주의 groEL2 유전자 분절의 데이터베이스는 서열목록상 서열번호 3 내지 서열번호 42로 표시되는 염기서열이다.

<45> 표준 균주와 목적 균주의 groEL2 염기서열을 분석한 후에 서열 비교하여 해당 균주인 것으로 결정을 내릴 때, 정렬된 데이터베이스에 동정하고자 하는 균의 염기서열을 분석하여 데이터베이스에 추가시킨 후에 다시 염기서열 정렬을 수행한 후 계통도를 완성하면 균종에 근접하여 가지를 형성하게 되어 계통도로 균종을 결정할 수도 있다. 또한, 서열 상동성으로 결정하면 99.8% 이상의 상동성을 보이는 균종으로 동정하는 것도 가능하다. 왜냐하면, 같은 균종 사이의 염기서열 변이가 0.2%를 넘지 않기 때문이다.

<46> 본 연구에서 구축된 스트렙토미세스 속 균주 groEL2 데이터베이스를 실제로 분류에 적용될 수 있는지를 검증하기 위하여 비표준 균주 총 5주를 대상으로 groEL2 염기서열을 분석하여 비교염기서열 분석방법으로 동정을 실시한 결과, 비표준 균주인 스트렙토미세스 하이드로스코피커스(*S. hydroskopicus*) 3주(KCTC 9030, KCTC 9031, KCTC 9069)는 각각 100%, 99.8%, 99.8%의 염기서열 동질성을 보이면서 계통수상에서 표준 균주인 스트렙토미세스 하이드로스코피커스(KCTC 9782)에 위치함을 확인하였다[도 5]. 비표준 균주인 스트렙토미세스 알버스(*S. albus*) 2주(KCTC 1136, KCTC 1533)는 각각 99.8%, 100% 염기서열 동질성을 보이면서 계통수 상에서 표준 균주인 스트렙토미세스 알버스(KCTC 1082)에 위치함을 확인하였다[도 6].

<47> 결론적으로, 균 동정에 이용될 수 있는 표준 시계분자의 특성으로는 각 종간의 염기서열 다양성(interspecies variation) 이외에, 같은 종 안에서의 염기서열 보존성(intrasppecies conservation)이 확인되어야 한다. 각 종간의 염기서열 다양성은 위에서 상술하였고, 같은 종 안에서의 염기서열 보존성이 5균주의 비표준 균주의 염기서열에 의하여 증명되었다. 5 주의 비표준 균주를 각각의 표준 균주와 비교하여 보았을 때, 99.8% ~ 100%의 염기서열 동질성을 보였다. 그리고, 비교염기서열 분석방법에 의해 5 균주의 비표준 균주를 100% 동정할 수 있었다.

<48> 따라서, 본 발명은 기존의 형태학적 분류법이 갖는 시간, 정확성의 문제점을 해소하며, 또한 요즘 일반적으로 사용되고 있는 16S rDNA 동정법의 갖는 시간, 비용상의 문제점을 해결하여 간편하고, 경제적이며 정확성이 높은 동정법을 제공함으로써 향후 스트렙토미세스 속 균종의 동정에 널리 이용될 수 있다.

<49> 이하, 본 발명은 다음 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명하겠는바, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

<50> [실시예]

<51> 균주

<52> 국제적으로 공인된 국내 균주 보관센터인 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC)에서 보관 중인 스트렙토미세스 38 균주, 및 기타 방선균으로서 로도코커스(*Rhodococcus*) 1 균주, 슈카무렐라(*Tsukamurella*) 1 균주 등 총 40개의 표준 균주를 대상으로 groEL2 염기서열을 분석한

다. 또한, 구축된 데이터베이스를 이용하여 균주 동정에 이용될 비표준 균주 2종(, *S. albus*)의 총 5주의 균주를 대상으로 비교염기서열 분석방법을 수행한다[표 1].

<53> 【표 1】

스트렙토미세스 표준 균주					
No	Name	Source	No	Name	Source
1	<i>S. acrimycinii</i>	KCTC 9679 <sup>T</sup>	20	<i>S. cinnamomensis</i>	KCTC 9708 <sup>T</sup>
2	<i>S. aculeolatus</i>	KCTC 9680 <sup>T</sup>	21	<i>S. cinereoruber</i>	KCTC 9707 <sup>T</sup>
3	<i>S. elanosinicus</i>	KCTC 9683 <sup>T</sup>	22	<i>S. cirratus</i>	KCTC 9709 <sup>T</sup>
4	<i>S. albireticuli</i>	KCTC 9744 <sup>T</sup>	23	<i>S. coeruleorubidus</i>	KCTC 1743 <sup>T</sup>
5	<i>S. albofaciens</i>	KCTC 9686 <sup>T</sup>	24	<i>S. collinus</i>	KCTC 9713 <sup>T</sup>
6	<i>S. albogriseolus</i>	KCTC 9675 <sup>T</sup>	25	<i>S. corchorusii</i>	KCTC 9715 <sup>T</sup>
7	<i>S. alboniger</i>	KCTC 9014 <sup>T</sup>	26	<i>S. diastaticus</i>	KCTC 9142 <sup>T</sup>
8	<i>S. albus</i>	KCTC 1082 <sup>T</sup>	27	<i>S. djakartensis</i>	KCTC 9722 <sup>T</sup>
9	<i>S. ambofaciens</i>	KCTC 9111 <sup>T</sup>	28	<i>S. erumpens</i>	KCTC 9729 <sup>T</sup>
10	<i>S. aminophilus</i>	KCTC 9673 <sup>T</sup>	29	<i>S. fulvissimus</i>	KCTC 9779 <sup>T</sup>
11	<i>S. anandii</i>	KCTC 9687 <sup>T</sup>	30	<i>S. galilaeus</i>	KCTC 1919 <sup>T</sup>
12	<i>S. argenteolus</i>	KCTC 9695 <sup>T</sup>	31	<i>S. griseochromogenes</i>	KCTC 9027 <sup>T</sup>
13	<i>S. bambusicola</i>	KCTC 9019 <sup>T</sup>	32	<i>S. griseolus</i>	KCTC 9028 <sup>T</sup>
14	<i>S. capillispialis</i>	KCTC 1719 <sup>T</sup>	33	<i>S. griseoviridis</i>	KCTC 9780 <sup>T</sup>
15	<i>S. cerpinensis</i>	KCTC 9128 <sup>T</sup>	34	<i>S. humiferus</i>	KCTC 9116 <sup>T</sup>
16	<i>S. catenulae</i>	KCTC 9223 <sup>T</sup>	35	<i>S. hygroscopicus</i>	KCTC 9782 <sup>T</sup>
17	<i>S. cellulosae</i>	KCTC 9703 <sup>T</sup>	36	<i>S. minutiscleroticus</i>	KCTC 9123 <sup>T</sup>
18	<i>S. chartreusis</i>	KCTC 9704 <sup>T</sup>	37	<i>S. murinus</i>	KCTC 9492 <sup>T</sup>
19	<i>S. chattanoogensis</i>	KCTC 1087 <sup>T</sup>	38	<i>S. nodosus</i>	KCTC 9035 <sup>T</sup>
스트렙토미세스 비표준 균주					
1	<i>S. hydroscopicus</i>	KCTC 9030	4	<i>S. albus</i>	KCTC 1136
2	<i>S. hydroscopicus</i>	KCTC 9031	5	<i>S. albus</i>	KCTC 1533
3	<i>S. hydroscopicus</i>	KCTC 9069			
기타 방선균주					
1	<i>R. equi</i>	KCTC 9082	2	<i>T. paurometabola</i>	KCTC 9821

약어: KCTC: Korean Collection for Type Cultures

<54> 실시예 1: 스트렙토미세스 속 특이 groEL2 프라이머의 제조

<55> 모든 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자 분절을 증폭시킬 수 있는 특이적인 정방향 프라이머(STGROF1)와 역방향 프라이머(STGROR2)를 제조하여 사용한다. 스트렙토미세스 속 균종 중에서 다른 목적으로 전체 groEL2 유전자의 염기서열이 분석된 스트렙토미세스 리비

단스(GenBank No. X95971), 스트렙토미세스 알버스(GenBank No. M76658) 2주의 염기서열과 계통학적으로 가장 유사한 슈카무렐라(Tsukamurella) 속 균종인 슈카무렐라 파우로메타볼라(GenBank No. AF352578) 1주의 총 3주의 염기서열을 분석하여 모든 스트렙토미세스 속 균종을 증폭시킬 수 있는 프라이머쌍 정방향 프라이머 STGR0F1(5'-CCATGCCAAGGAGATCGAGCT-3' : 서열번호 1)과 역방향 프라이머 STGR0R2(5'-TGAAGGTGCCRCGGATCTTGT-3' : 서열번호 2)를 제조하였다[도 1]. 이 프라이머 쌍은 아직 스트렙토미세스 속 균종의 증폭을 위하여 사용된 적이 없는 새로운 프라이머 쌍이다.

<56> 도 1에서는 본 특허에서 사용된 프라이머의 위치를 잘 보여준다. 본 특허에서 증폭한 groEL2 유전자 분절은 스트렙토미세스 알버스 1623-bp 전체 유전자 중에서 161번째 염기서열부터 808-bp번째의 염기서열 총 648-bp의 염기서열을 표적으로 사용하였다. 스트렙토미세스 속 균종의 648-bp의 groEL2 유전자 분절의 염기서열을 증폭시키기 위하여 각각 스트렙토미세스 알버스의 염기서열 중에서 161번째부터 182번째까지의 총 22개의 염기로 구성된 정방향 프라이머와 787번째 염기서열부터 808번째 염기로 구성되는 총 22개의 염기로 구성된 역방향 프라이머를 이용하였다. 이 두 프라이머 부위는 스트렙토미세스 속 균종에 속하는 스트렙토미세스 리비단스와 스트렙토미세스 알버스와 100% 염기서열 상동성을 보일 뿐만 아니라 다른 속 균종인 슈카무렐라 파우로메타볼라(*T. paurometabola*)와도 100% 상동성을 보이는 계통학적으로 보존된 부위를 사용하였다.

<57> 실시예 2: 스트렙토미세스 속 groEL2 420-bp 분절의 제조

<58> 1) DNA 추출

<59> BB/P(Bead beater phenol) 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 균의 집락을 취하여, TEN 버퍼(Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM: pH 8.0)에 부유시킨 후에 직경 0.1 mm 초자구(diameter 0.1 mm; Biospec Products, Bartlesville, Okla., U.S.A.) 100  $\mu$ l(packing volume)과 페놀/클로로포름/이소프로필알코올 (50/49/1) 용액 100  $\mu$ l를 함께 부유시켜 미니 비터(mini beater)로 1 분간 진탕하여 균체를 파쇄하였다. 균 파쇄액은 12,000 rpm으로 5 분간 원심분리하고 상등액(100  $\mu$ l)을 새로운 튜브에 옮긴 후, 60  $\mu$ l의 이소프로필알코올을 섞고, 다시 15000 rpm으로 15 분간 원심분리하였다. 침전물은 70% 에탄올로 세척한 후 TE (pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 버퍼 60  $\mu$ l로 DNA를 회수하였다.

<60> 2) 중합효소 연쇄반응에 의한 groEL2 유전자 증폭

<61> 스트렙토미세스 속에 특이적인 정방향 프라이머(STGROF1)와 역방향 프라이머(STGROR2)를 제조하여 사용하였다. PCR은 2 unit의 Taq 중합효소, 10 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>을 포함하는 AccuPower PCR PreMix[Bioneer, Korea]를 이용하였다. 주형 DNA 50 ng, 프라이머 SRPOF1, SRPOR2 각각 20 pmol을 넣고, 최종 부피가 20  $\mu$ l가 되도록 종류수를 첨가하여 혼합물을 만들었다. PCR은 첫 번째 변성(denaturation)단계 95 °C 5분, 변성단계 95 °C 1분, 어닐링(annealing) 62 °C 45초, 신장(extension)단계 72 °C 1분 30초 및 최종 신장(final extension) 단계 72 °C 5분으로 30회 수행하였다[Model 9600 thermocycler, Perkin-Elmer cetus]. PCR 후, 1% 아가로스 젤에 전기영동하여 648-bp의 반응산물을 확인하였다.

<62> 전기에서 선정된 방선균 속 균종을 증폭시킬 수 있는 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과 40 주의 표준균주 전부에서 648-bp의 groEL2 유전자 분절을 생산함을 1% 아가로스 젤 전기영동 상에서 확인할 수 있었다[도 2]. 또한, 스트렙토미세스 속 균종 뿐

만 아니라, 희소방선균에 속하는 로도코커스 속 및 슈카무렐라 속 균종도 증폭시킴을 확인할 수 있었다.

<63> 3) 중합효소 연쇄반응 산물의 정제

<64> 1% 겔에 전기영동 후, 스트렙토미세스 표준균주 648-bp의 반응산물 부위의 겔을 자른 다음 새로운 투브에 옮겨 DNA를 추출하였다. DNA 추출 및 정제는 Qiaex[Qiagen, Germany] 시스템을 이용하였다. 겔 용해 용액 QX1 500  $\mu\text{l}$ 을 겔이 들어있는 투브에 첨가한 후 50 °C에 15분간 방치하여 겔을 완전히 녹였다. 그 후 겔 비드를 10  $\mu\text{l}$ 을 첨가하여 완전히 섞은 후에 50 °C에 15분간 방치하였다. 그 사이 1분 간격으로 투브를 10초씩 볼텍스(vortex)를 수행하여 비드가 골고루 퍼지도록 하였다. 이 후 QX1으로 1번, QF로 2번 세척한 후 45 °C에서 10분간 건조시킨 후 TE 버퍼 20  $\mu\text{l}$ 로 DNA를 회수하였다.

<65> 실시예 3: groEL2 분절의 자동염기서열 분석

<66> 자동 염기서열 분석은 겔 용출 산물을 주형 DNA로 사용하였다. 주형DNA 60 ng, 프라이머 1.2 pmol, BigDye 터미네이터 사이클 시퀀싱 커트[PE Applied Biosystems] 2  $\mu\text{l}$ 을 섞고, 증류수를 첨가하여 총 부피 10  $\mu\text{l}$ 가 되도록 제조하였다. 반응은 Perkin Elmer Cetus 9600 을 사용하여, 95 °C 10 초, 60 °C 10 초, 60 °C 4 분으로 25 사이클을 실시하였다. 반응이 끝난 시료는 에탄올 침전방법으로 DNA를 정제하였다. 즉, 증류수 180  $\mu\text{l}$ , 3 M 소듐 아세테이트 10  $\mu\text{l}$ 을 첨가하여 총 200  $\mu\text{l}$ 로 만든 후, 이 혼합물에 2배 부피의 100% 에탄올을 첨가하여 잘 섞은 다음 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 그 후 70% 에탄올 500  $\mu\text{l}$ 을 첨가한 후 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 DNA를 세척하였다. 그 후 DNA를

비이온화된 포름이미드(Deionized Formimide)[PE Applied Biosystems]로 회수하였다. 이렇  
게 정제된 DNA를 95 °C로 5분간 반응하여 단일가닥 DNA로 만든 후, ABI 3100 시스템을 이용하  
여 2시간 30분 동안 전기영동하여 염기서열을 분석하였다.

<67> 염기서열 분석방법은 정방향 프라이머 STGROF1을 사용하여 한쪽으로 염기서열을 분석하  
였고, 전체 648-bp 중에서 420-bp 혹은 423-bp의 염기서열을 결정하였다.

<68> 증폭된 중합효소 연쇄반응 산물을 전기에서 상술한 바 대로 정제한 후 클로닝 과정 없이  
직접 자동염기서열분석 방법으로 도 1에서 보여지는 것처럼 스트렙토미세스 알버스의 전체  
groEL2 염기서열 순서를 기준으로 232번째 염기에서 631번째 염기까지 420-bp의 염기서열을 분  
석하였다. 그 결과, 어떤 모호한 결과(표적유전자가 게놈 상에 여러 개 존재하고, 그들 사  
이의 염기서열이 다르면 다른 부위의 염기서열은 직접염기서열 분석상에서 염기서열이 겹쳐 나  
오기 때문에 정확한 염기서열을 결정할 수 없다) 없이 40주의 표준 균주 모두 420-bp의 염기를  
결정할 수 있었다.

<69> 이렇게 분석된 염기서열을 다정렬(multialignment)하여 서로의 염기서열을 비교해 본 결  
과, 첫째 40주 표준 균주 모두 서로 다른 염기서열을 갖고 있었다. 즉, 각 종간 염기서열  
다양성(interspecies variation)을 보여준다. 동정의 표적이 되는 유전자는 균종 동정에  
이용되기 위해서는 먼저 각 균종 간의 염기서열 다양성이 선행되어야 하는데 본 실험에서 그  
조건을 충족시킴을 확인할 수 있었다. 둘째, 스트렙토미세스 알버스의 전체 groEL2 염기서열  
순서를 기준으로 301 번째 염기에 아미노산 1개 즉 3-bp(GCG)가 삽입되어 423-bp를 가지고 있  
는 3주(

*S. ambofaciens*, *S. erumpens*, *S. murinus*)를 제외한 37주의 표준 균주 염기서열 모두 다정렬 상에서 염기서열 삽입(insertion)이나, 탈락(deletion) 없이 모두 420-bp의 염기를 코딩하고 있었다. 즉, 다정렬 상에서 어떠한 갭(gap)도 존재하지 않는다는 사실이다. 16S rDNA는 정렬상에서 높은 빈도로 갭이 존재한다. 다정렬할 때 일반적으로 갭은 그 부위에 해당되는 정렬된 유전자를 전부 제거하여 분석하는 경향이 있기 때문에 전체적인 계통수를 구축하는 데에 오류를 일으킬 확률이 높다고 알려져 있다. 따라서, 본 발명에서 사용된 즉 groEL2 유전자의 우수성을 다시 한 번 확인할 수 있다.

<70> 140개의 유도 아미노산, 즉 스트렙토미세스 알버스 전체 GROEL2 단백질 순서를 기준으로 78번째 아미노산부터 217번째 아미노산에 해당되는 부위를 다정렬한 결과 위에서 기술한 것처럼 스트렙토미세스 암보파시언스(*S. ambofaciens*), 스트렙토미세스 에魯펜스(*S. erumpens*), 스트렙토미세스 무리너스(*S. murinus*) 3개의 균주만이 스트렙토미세스 알버스 전체 GROEL2 단백질 순서를 기준으로 101번째 위치에 알라닌(alanine)이 첨가되어 141개의 아미노산을 코딩하고 있는 것을 제외하고는 나머지 37 개 표준 균주 모두 140개의 아미노산을 코딩하고 있음을 확인하였다. 또한, 40개의 표준 균주 중에서 아미노산 상동성을 기준으로 33개의 대립유전자 가 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 이러한 사실은 아미노산을 코딩하지 못하는 16S rDNA와 다르게 염기서열뿐만 아니라 유도 아미노산을 이용하여도 스트렙토미세스 균종간 감별에 이용할 수 있음을 시사한다.

<71> 실시예 4: groEL2 유전자 염기서열의 배열과 염기서열 상동성 분석 및 계통수의 완성

<72> 자동 염기서열 분석방법에 의해 분석되어진 40종의 스트렙토미세스 속 표준균주의 groEL2 염기서열(420-bp 혹은 423-bp)을 DNASTAR 소프트웨어의 Megalign 프로그램을 이용하여

다정렬(multialignment)을 수행하여 groEL2 데이터베이스를 구축하였다. 다정렬은 일단 420-bp 염기서열을 Megalign 프로그램에서 140개의 아미노산으로 번역(translation)시킨 후, 이 아미노산을 대상으로 Megalign 프로그램 안의 Clustal Method 방법으로 다정렬시켰다. 이렇게 정렬된 140개의 아미노산을 다시 420개의 염기서열로 변화시켜 방선균 균 동정 데이터베이스를 구축하였다. 40주 염기서열 각각에 대한 염기서열 상동성은 다정렬된 데이터베이스를 Megalign 프로그램 안의 시퀀싱 거리(sequence distance)를 이용하여 분석하였다.

<73> 염기서열 다정렬 후 위에 상술한 대로 40주 표준균주의 염기서열 동질성을 조사해보았다. 그 결과 40주 모두 서로 다른 염기서열 동질성을 보였다. 38 개의 스트렙토미세스 속에 속하는 균종의 상동성을 분석하여 본 결과, 88.4%(*S. griseolus*와 *S. albus* 사이의 염기서열 동질성)와 99.1%(*S. humiferus*와 *S. ambofaciens* 사이의 염기서열 동질성) 사이의 염기서열 상동성을 보여주었다.

<74> 따라서, 스트렙토미세스 속 균종 간에는 0.9 ~ 11.6%까지의 염기서열 이질성을 보임을 확인할 수 있었다. 스트렙토미세스 사이의 염기서열 이질성이 3%를 넘지 않는 16S rDNA에 비해 동정을 위한 표적 유전자의 가장 중요한 특성 중에 하나인 종간 염기서열 변이(interspecies variation)가 훨씬 높다는 것을 확인할 수 있었다. 38개의 스트렙토미세스 표준 균주의 염기서열을 다른 속에 속하는 로도코커스 에퀴(*R. equi*)와 슈카무렐라 파우로메타볼라(*T. paurometabola*)의 염기서열과 상동성을 비교하여 보았을 때 모두 85.5%(*S. anandi* 와 *R. equi* 사이의 염기서열 동질성)이하의 상동성을 보임을 확인할 수 있었다

<75> 38개의 스트렙토미세스 속에 속하는 유도 아미노산 상동성을 서로 비교하여 보았을 때에 91.4%(

*S. griseolus* 와 *S. albus* 사이의 아미노산 동질성) ~ 100%의 아미노산 상동성을 보여주었고, 이들을 다른 속에 속하는 로도코커스 에퀴와 슈카무렐라 파우로메타볼라의 아미노산과 상동성을 비교하여 보았을 때 모두 87.9%(*S. anandii* 와 *R. equi* 사이의 염기서열 동질성) 이하의 상동성을 보임을 확인할 수 있었다

<76> 각 균종 사이의 계통학적 유연관계(phylogenetic relationship)는 계통수 (phylogenetic tree)를 통하여 분석하였다. 계통수는 MEGA 소프트웨어를 이용하여 구축하였다. 다정렬된 40 주의 420-bp 염기서열을 Juke-Cantor 거리 측정법과 pair wise deletion 방법에 기초를 둔 Neighbor-Joining법으로 분석하여 계통수를 작성하였다. 부트스트랩(Bootstrap) 분석은 100 복제(replication)로 수행하였다.

<77> 유도 아미노산 염기서열 상동성과 계통수는 420-bp의 유전자 염기서열을 Megalign 프로그램에서 140개의 아미노산으로 번역(translation)시킨 후, Megalign 프로그램 안의 Clustal Method 방법으로 다정렬시켜 분석하였다.

<78> 다정렬된 40주의 염기서열을 위에서 상술한대로 Mega 소프트웨어를 이용하여 Neighbor-Joining 계통수를 구축하였다. 전체 계통수를 분석하였을 때 40주 모두 다른 염기서열을 보이면서 40개의 독특한 분절을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 38주의 스트렙토미세스 속 균주가 다른 속에 속하는 로도코커스 에퀴와 슈카무렐라 파우로메타볼라에 대해 독립적인 하나의 그룹을 형성함을 확인할 수 있었다[도 3].

<79> 유도 아미노산을 Megalign 프로그램 안의 Clustal Method 방법으로 다정렬 시켜 분석한 결과 40주의 표준 균주 중에서 서로 다른 아미노산을 코딩하는 33 개의 대립유전자가 같은 수의 분절을 형성함을 확인할 수 있었다. 마찬가지로 33개의 분절은 다른 속에 속하는 로도

코커스 에퀴와 슈카무렐라 파우로메타볼라에 대해 독립적인 하나의 그룹을 형성함을 확인할 수 있었다[도 4].

<80> 실시예 5: 40종의 표준 균주 데이터베이스를 이용한 비교 염기서열 분석방법에 의한 비표준 균주 동정 실시

<81>      상기 표 1에 나타난 바와 같이 비표준 균주인 스트렙토미세스 하이드로스코피커스 3주 (KCTC 9030, KCTC 9031, KCTC 9069) 및 스트렙토미세스 알버스 2주 (KCTC 1136, KCTC 1533)의 총 5주를 대상으로 균 동정을 실시하였다.      균 동정은 각각의 균주의 420-bp의 groEL2 염기서열을 전기에서 상술한 방법대로 결정한 다음, 40주의 염기서열이 축적되어 있는 DN Astar 소프트웨어의 Megalign 프로그램에 대입한 후 전기에서 상술한 대로 다정렬을 수행한 후, Mega 소프트웨어의 Neighbor-Joining 법으로 계통수를 완성하여 균 동정을 실시하였다.

<82>      완성된 40주의 표준균주 데이터베이스가 실제로 균 동정에 적용될 수 있는지를 확인하기 위하여, 위에서 상술한대로 비표준 균주인 스트렙토미세스 하이드로스코피커스 3주(KCTC 9030, KCTC 9031, KCTC 9069), 그리고 스트렙토미세스 알버스 2주(KCTC 1136, KCTC 1533)의 총 5주를 대상으로 비교염기서열 분석 방법에 의해 균 동정을 실시하였다.

<83>      그 결과, 비표준 균주인 스트렙토미세스 하이드로스코피커스 3주(KCTC 9030, KCTC 9031, KCTC 9069)는 각각 100%, 99.8%, 99.8%의 염기서열 동질성을 보이면서 계통수상에서 표준 균주인 스트렙토미세스 하이드로스코피커스(KCTC 9782)에 위치함을 확인하였다[도 5].      비표준 균주인 스트렙토미세스 알버스 2주(KCTC 1136, KCTC 1533)는 각각 99.8%, 100% 염기서열 동질

성을 보이면서 계통수 상에서 표준 균주인 스트렙토미세스 알버스(KCTC 1082)에 위치함을 확인하였다[도 6].

### 【발명의 효과】

<84> 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 groEL2 유전자를 이용한 스트렙토미세스 속 균종 동정방법은 기준의 형태학적 분류법이 갖는 시간, 정확성의 문제점을 해소하며, 또한 요즘 일반적으로 사용되고 있는 16S rDNA 동정법이 갖는 시간, 비용상의 문제점을 해결하여 간편하고, 경제적이며 정확성이 높은 동정법을 제공함으로써 향후 스트렙토미세스 속 균종의 동정에 널리 이용될 수 있다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

스트렙토미세스 균종의 groEL2 유전자 분절을 특이적으로 증폭시키며, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프라이머

**【청구항 2】**

스트렙토미세스 균종의 groEL2 유전자 분절을 특이적으로 증폭시키며, 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 프라이머.

**【청구항 3】**

서열번호 3 내지 서열번호 42로 표시되는 염기서열로 이루어진 군에서 선택되며, 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2의 분절 또는 이들의 단편을 포함하는 폴리뉴클레오타이드.

**【청구항 4】**

- 1) 스트렙토미세스 속 균주의 groEL2 유전자 분절을 특이적으로 증폭시키는 프라이머를 이용하여 목적 균주의 groEL2 유전자 분절을 증폭하는 단계;
- 2) 상기 증폭된 groEL2 유전자 분절의 염기서열을 분석하는 단계; 및
- 3) 상기에서 분석된 염기서열과 표준 균주의 groEL2 유전자 분절의 염기서열을 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 스트렙토미세스 속 균종의 동정방법.

**【청구항 5】**

제 4 항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 프라이머로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 프라이머인 것을 특징으로 하는 동정방법.

**【청구항 6】**

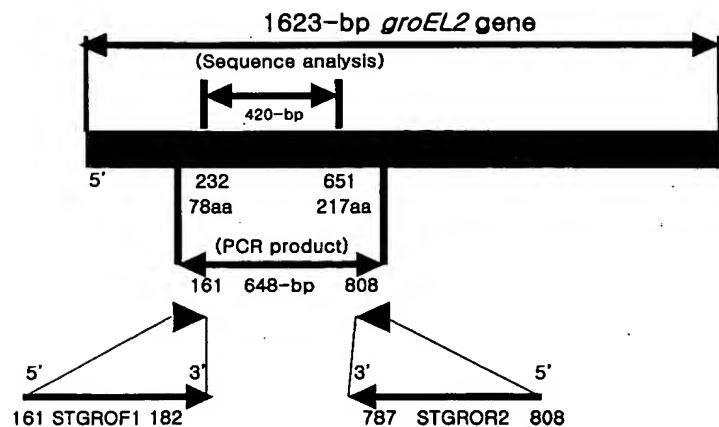
제 4 항에 있어서, 상기 표준 균주의 groEL2 유전자 분절은 서열번호 3 내지 서열번호 42로 표시되는 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 동정방법.

**【청구항 7】**

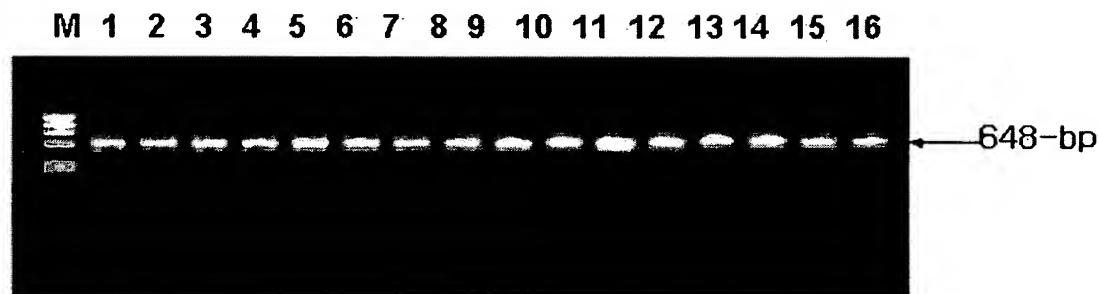
제 4 항에 있어서, 상기 3) 단계에서 목적 균주의 groEL2 유전자 분절의 염기서열을 표준 균주의 groEL2 유전자 분절의 염기서열에 대입하여 다정렬한 후 계통도를 완성하여 결정하는 것을 특징으로 하는 동정방법.

## 【도면】

## 【도 1】

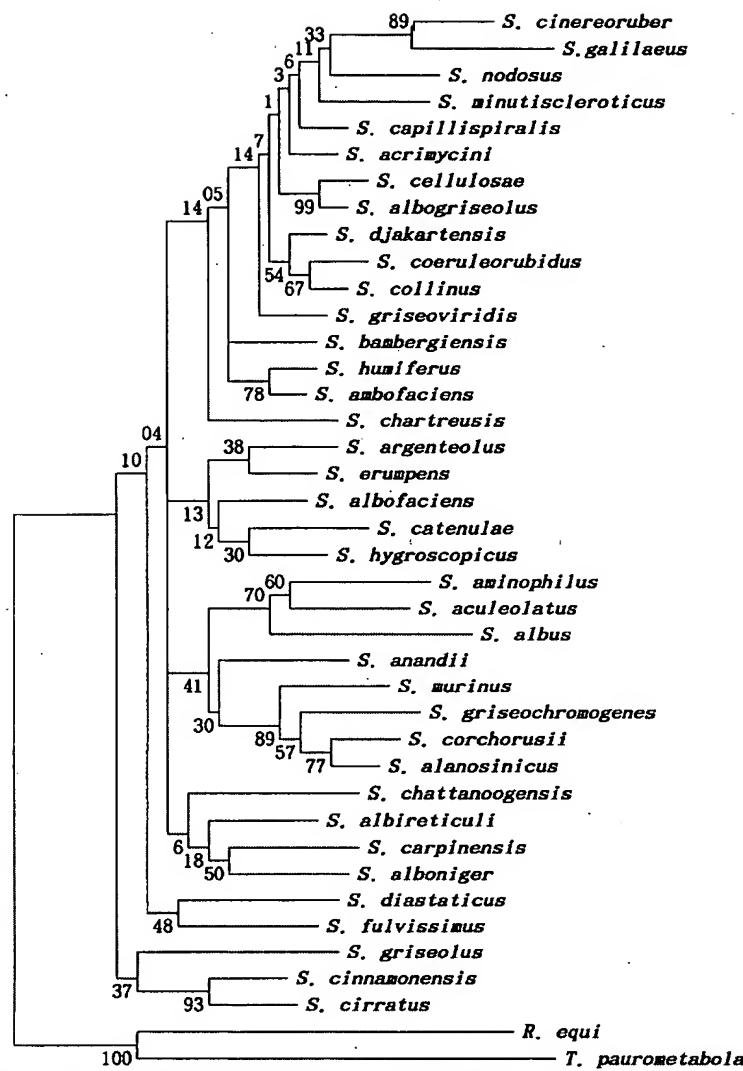


## 【도 2】



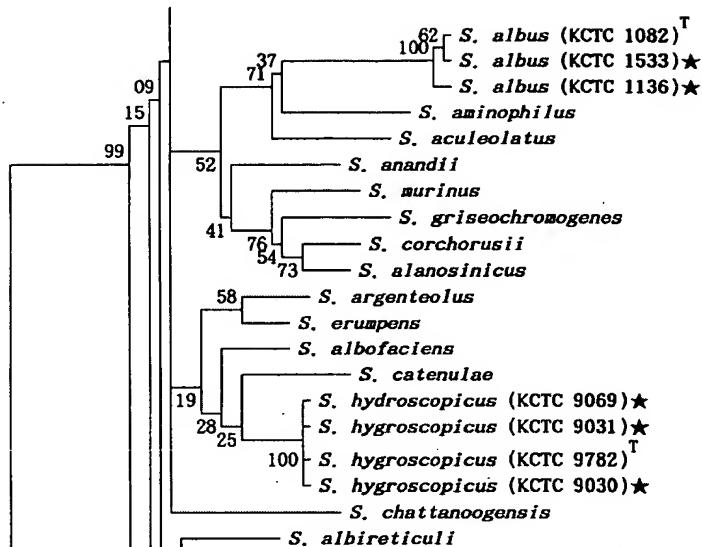
M:  $\phi$ X174 DNA 크기 마커, 1: *S. aculeolatus*, 2: *S. albireticuli*,  
 3: *S. albofaciens*, 4: *S. albus*, 5: *S. aminophilus*,  
 6: *S. argenteolus*, 7: *S. carpinensis*, 8: *S. chartreusis*,  
 9: *S. cinnamoneensis*, 10: *S. coeruleorubidus*, 11: *S. diastaticus*,  
 12: *S. erumpens*, 13: *S. griseolus*, 14: *S. hygroscopicus*,  
 15: *R. equi*, 16: *T. paurometabola*

## 【도 3】

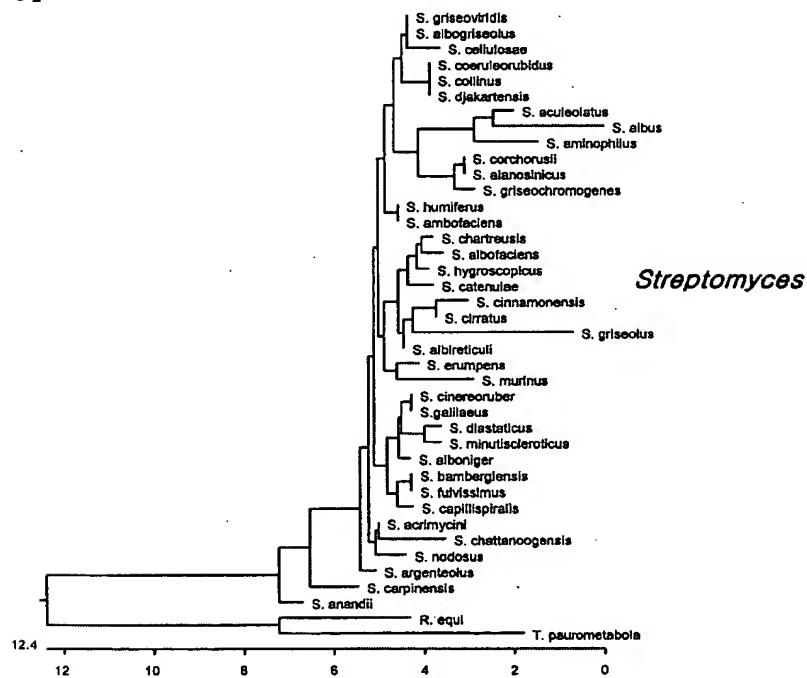


Scale: each — is approximately equal to the distance of 0.617934

【도 4】



【도 5】



★: 비표준 균주, T: 표준 균주

## 【서열 목록】

&lt;110&gt; Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology &lt;120&gt;

Identification method of genus streptomyces by using groEL2 gene &lt;160&gt; 42 &lt;170&gt;

Kopatent In 1.71 <210> 1 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence  
 <220> <223> forward primer STGROF1 <400> 1 ccatcgccaa ggagatcgag ct  
 22 <210> 2 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 reverse primer STGR0R2 <400> 2 tgaaggtgcc rcggatcttg tt  
 22 <210> 3 <211> 420 <212> DNA <213> S. acrimycini <400> 3 aagaagacgg  
 acgacgtcgc cggtgacggt acgaccacccg cgaccgttct cggccaggcc 60 ctggtcaggg  
 agggcctgcg caacgtcgcc gccggcgcca acccgatggc tctgaagcgc 120 ggcatcgaga  
 aggccgtcga ggccgtctcc gccggccctgc tggagcaggc gaaggacgtc 180 gagaccaagg  
 agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccggccgacac ccagatcgcc 240 gagctcatcg  
 ccgaggccat ggacaaggcgc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300 tcccagaccc  
 tcggcttgaa gctggagctc accgagggta tgcgcttcga caaggctac 360 atctcggcgt  
 acttcgcccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcctcga cgaccctac 420  
 420 <210> 4 <211> 420 <212> DNA <213> S. aculeolatus <400> 4  
 aagaagacgg acgacgtcgc cggtgacggc acgaccacccg cgaccgttct cggccaggcc 60  
 ctggtaaagg agggcctgcg gaacgtggcc gccggcgcca acccgatggc gctgaagcgc 120  
 ggcatcgaga aggccaccga ggccgtctcc gccggccctgc tggagcaggc caaggacgtc 180  
 gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccggccgacac ccagatcgcc 240  
 gagctgatcg ccgaggccat ggacaaggcgc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300  
 tcgcagaccc tcggttgaa gcttgagctc accgagggca tgcgcttcga caaggctac 360  
 atctccgcct acttcgcccac cgacatggag cgcacatggagg cggagctcga ggaccctac 420  
 420 <210> 5 <211> 420 <212> DNA <213> S. alanosinus <400> 5

aagaagacgg acgacgtcgc cggtgacggt acgaccaccg cgaccgtgct cggccaggcc	60
ctggtaagg aaggcctgcg caacgtcgcc gccggcgcca acccgatggc cctgaagcgc	120
ggtatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc gccgccctgc tggagcaggc gaaggacgtc	180
gagaccaagg agcagatcgc ctccaccgac tccatctccg ccgcccacac ccagatcggc	240
gagctcatcg ccgaggccat ggacaaggc ggcaaggaag gcgtcatcac cgctcgaggag	300
agcaacacct tcggtctgga gcttgagctc accgaggca tgcgcttcga caaggctac	360
atctccgcct acttcgac cgacatggag cgcatggagg cggtgctcga ggaccctac	420
420 <210> 6 <211> 420 <212> DNA <213> S. albireticuli <400> 6	
aagaagacgg acgacgtcgc cggtgacggc acgacgaccg cgaccgtcct cggccaggcg	60
ctggtcccgcg agggtctgcg caacgtggcc gccggtgcca acccgatggc cctgaagcgt	120
ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc gccgccctgc tcgagcaggc caaggacgtg	180
gagaccaagg agcagatcgc ctccaccgac tccatctccg ccgcccacac ccagatcggc	240
gagctcatcg ccgaggcgat ggacaaggc ggcaaggaag gcgtcatcac cgctcgaggag	300
tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgagggtt tgcgcttcga caaggctac	360
atctcggcgt acttcgac acatggag cgtatggagg cgtcgctcga cgaccctac	420
420 <210> 7 <211> 423 <212> DNA <213> S. albofaciens <400> 7	
aagaagacgg acgacgtcgc cggtgacggc acgaccaccg cgaccgtcct ggcccaggcc	60
ctggcacatcg cggagggcct ggcacacgtc gccggcgccg ccaaccgtt ggccctcaag	120
cgcgtatcg agcgcgcgt cgaggccgtc tccggccccc tgctggagca ggcgaaggac	180
gtggagacca aggaggcagat cgcctccacc gcctccatct ccgcccggca cacccagatc	240
ggcgagctga tcggcgaggc catggacaag gtcggcaagg aaggcgtcat caccgtcgag	300

gagtcccaga cttcggtct ggaactggag ctcaccgagg gatatgcgtt cgacaaggcg 360  
 tacatctcg cgtacttcgc caccgacatg gagcgtatgg aggcgtcgct cgacgaccgc 420 tac  
 423 <210> 8 <211> 420 <212> DNA <213> *S. albogriseolus* <400> 8  
 aagaagacgg acgacgtcgc cggtgacggt acgaccacgg cgaccgttct cgcccaggcc 60  
 ctggtaagg agggcctgca acacgtcgcc gccggcgcca acccgatggc cctgaagcgc 120  
 ggtatcgaga aggcgtcga ggccgtctcc gccggcctcc tggagcaggc gaaggacgtg 180  
 gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgcccacac ccagatcgcc 240  
 gagctcatcg ccgaggccat ggacaaggc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300  
 tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgaggta tgcgcttcga caaggctac 360  
 atctcgccgt acttcgcccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcctcga cgaccgtac 420  
 420 <210> 9 <211> 420 <212> DNA <213> *S. alboniger* <400> 9 aagaagacgg  
 acgacgtcgc cggtgacggc acgacgaccg cgaccgtctt ggcccaggcc 60 ctggtgccgc  
 agggtctgca acacgtggcc gccggtgcca acccgatggc cctcaagcgc 120 ggcacatcgaga  
 agggcgtcga ggccgtctcc ggtggccctcc tcgagcaggc gaaggatgtc 180 gagaccaagg  
 agcagatcgc ttccacggcc tccatctccg ccgcccacac ccagatcgcc 240 gagctgatcg  
 ccgaggccat ggacaaggc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300 tcccagacct  
 tcggtctgga gctggagctc accgaggta tgcgcttcga caaggctac 360 atctcgccgt  
 acttcgcccac cgacatggag cgtatggagg cgtcgctcga cgaccgtac 420  
 420 <210> 10 <211> 420 <212> DNA <213> *S. albus* <400> 10 aagaagacgg  
 acgacgtcgc cggtgacggc acgacgaccg cgaccgtctt ggcccaggcg 60 ctggtccgc  
 agggtctgca acacgtcgcc gcggggcgcca acccgatggc cctcaagcgc 120 ggtatcgaga

aggccaccga	ggctgtctcc	gctgccctgc	tggagcaggc	caaggacatc	180	gagaccaagg
agcagatcgc	ctccaccgccc	tcgatctccg	ccggcgacat	ccagatcggt	240	gagctgatcg
ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300	tcgcagacct
tcggtctcga	gctggagctc	accgagggca	tgcgcttcga	caagggctac	360	atctccgcct
acttcgcccac	cgacatggag	cgcattggagg	cggagctcga	ggaccctgtac	420	
420 <210>	11 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. ambofaciens <400>	11	
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggt	acgaccacccg	cgaccgttct	60	cgcccaggcc
ctggtaaagg	aaggcctgcg	caacgtcgcg	gccggcgcca	acccgatggc	120	cctgaagcgc
ggcatcgaga	aggccgtcga	ggccgtctcc	gccgccctgc	tggagcaggc	180	gaaggacgtc
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccacggcc	tccatctccg	ccgcccacac	240	ccagatcgcc
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	300	cgtcgaggag
tcccagaccc	tcggtctgga	gctggagctc	accgagggta	tgcgcttcga	360	caagggctac
atctcggcgt	acttcgcccac	cgacatggag	cgtatggagg	cgtcgctcga	420	cgaccctgtac
420 <210>	12 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. aminophilus <400>	12	
aagaagacgg	acgacgtcgc	ctgtgacggc	acgacgaccg	cgaccgtcct	60	ggcccaggcc
ctggtaaagg	aaggcctgcg	caacgtcgcc	gccggcgcca	acccgatggc	120	cctgaagcgc
ggcatcgagg	gcccaccgga	ggccgtctcc	gccgccctgc	tggagcaggc	180	gaaggacgtg
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccacggcc	tccatctccg	ctgcccacac	240	ccagatcgcc
gagctgatcg	ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	300	cgtcgaggag
tcgcagaccc	tcggtctcga	gctggagctc	accgagggca	tgcgcttcga	360	caagggctac
atctccgcct	acttcgcccac	cgacatggag	cgcattggagg	cggagctgga	420	ggaccctgtac

420 <210>	13 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. anandii <400>	13	aagaagacgg
acgacgtcgc cggtgacggt acgaccacccg cgaccgtgct cgcccaggcc						60 ctggtccgcg
aggcctgcg caacgtggcc gccggcgcca acccgatggc tctgaagcgc						120 ggtatcgaga
aggccgtcga ggccgtctcc gccgcccgtc tcgaccaggc caaggaggc						180 gagaccaagg
agcagatcgc ctccaccgccc tccatctccg ccgcccacac ccagatcgcc						240 gagctcatcg
ccgaggccat ggacaaggc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag						300 tcgcagacct
tcggtctgga gctcgagctc accgagggca tgcgcttcga caaggctac						360 atctccgcct
acttcgcccac cgacatggag cgcatggagg cgtcgctcga ggaccggc						420
420 <210>	14 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. argenteolus <400>	14	
aagaagacgg acgacgtcgc cggtgacggc acgacgaccg cgaccgtcct ggcccaggcc						60
ctggtccgcg agggcctgcg caacgtcgcc gccggcgcca acccgatggc cctcaagcgc						120
ggtatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc gccgcccgtc tcgagcaggc caaggacgtg						180
gagaccaagg agcagatcgc ttgcaccgccc tccatctccg ccgcccacac ccagatcgcc						240
gagctgatcg ccgaggccat ggacaaggc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag						300
tcccagaccc ttgggctgga gctggaactc accgagggta tgcgcttcga caaggctac						360
atctccgcgt acttcgcccac cgacatggag cgcatggaa ccgcgtcga cgaccggc						420
420 <210>	15 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. bambergiensis <400>	15	
aagaagacgg acgacgtcgc cggtgacggt acgaccacccg cgaccgttct cgcccaggcc						60
ctggtcaagg agggcctgcg caacgtagcc gccggcgcca acccgatggc cctcaagcgc						120
ggtatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggtgccctgc tggagcaggc gaaggacgtc						180
gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgcccacac ccagatcgcc						240

gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggctgga	gctcgagctc	accgagggca	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctcggcgt	acttcgcccac	cgacatggag	cgtatggagg	cgtcgctcga	cgaccctgac	420
420 <210>	16 <211>	420 <212>	DNA <213>	<i>S. capillispiralis</i> <400>		16
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggt	acgaccaccg	cgaccgtcct	cgcccaggcc	60
ctggtaaagg	agggcctgcg	caacgtcgcc	gccggcgcca	acccgatggc	tctgaagcgc	120
ggtatcgaga	aggccgtcga	ggccgtctcc	ggtgccctgc	tggagcaggc	gaaggatgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccacggcc	tccatctccg	ccgcccacac	ccagatcggc	240
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggctgga	gctggagctc	accgagggta	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctcggcgt	acttcgcccac	cgacatggag	cgtatggagg	ccgtcctcga	cgaccctgac	420
420 <210>	17 <211>	420 <212>	DNA <213>	<i>S. carpinensis</i> <400>		17
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgacgaccg	cgaccgtcct	ggcccaggcg	60
ctggtccgca	agggcctgcg	caacgtggcc	gcgggtgcca	acccgatggc	cctgaagcgc	120
ggcatcgaga	aggccgtcga	ggccgtctcg	ggcgccctgc	tcgaccaggc	caaggaggtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccacggcc	tccatctccg	ccgcccacac	ccagatcggc	240
gagctgatcg	ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggctgga	gctggagctc	accgagggta	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctcggcgt	acttcgca	cgacatggag	cgcattggagg	cgccgctcga	cgaccctgac	420
420 <210>	18 <211>	422 <212>	DNA <213>	<i>S. catenulae</i> <400>		18
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgacgaccg	cgaccgtcct	ggcccaggcg	60

ctggtccgcg	agggcctccg	taacgtcgcc	gccggtgcca	acccgatggc	cctcaagcgg	120
ggcatcgaga	ccgcccgtcga	ggccgtctcc	gccgccctgc	tggagcaggc	caaggacgtg	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ttcgaccgcc	tccatctccg	ccgcccacac	ccagatcggc	240
gagctgatcg	ccgaggccat	ggacaaggc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggtctgga	gctggagctc	accgaggta	tgcgcttcga	caaggctac	360
atctcggcgt	acttcgcccac	cgacatggag	cgtatggagg	cgtcgctcga	cgaccgtac	420 at
422 <210>	19 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. cellulose	<400>	19
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggt	acgaccacgg	cgaccgttct	cggccaggcc	60
ctggtcaagg	agggcctgcg	caacgtcgcc	gccggcgcca	acccgatggc	cctgaagcgc	120
ggtatcgaga	aggccgtcga	ggccgtctcc	gccgccctgc	tggagcaggc	gaaggacgtg	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ttccacggcc	tccatctccg	ccgcccacgt	ccagatcggc	240
gagctcatcg	ccgaggcgat	ggacaaggc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggtctgga	gctggagctc	accgaggta	tgcgcttcga	caaggctac	360
atctcggcgt	acttcgcccac	cgacatggag	cgtatggagg	ccgtcctcga	cgaccgtac	420
420 <210>	20 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. chartreusis	<400>	20
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggt	acgaccacgg	cgaccgttct	cggccaggcc	60
ctggtcaagg	agggcctgcg	caacgtagcc	gccggcgcca	acccgatggc	cctcaagcgc	120
ggtatcgagc	gtgccgtcga	ggccgtctcc	gccgccctgc	tgcgcttcga	caaggatgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ttccacggcc	tccatctccg	ccgcccacac	ccagatcggc	240
gagctcatcg	ccgaggcgat	ggacaaggc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggtctgga	gctggagctc	accgaggta	tgcgcttcga	caaggctac	360

atctcggcgt	acttcgccac	cgacatggag	cgatggagg	cgtcgctcga	cgaccgtac	420
420 <210>	21 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. chattanoogensis	<400>	21
aagaagacgg	actacgtcgc	cggtgacggc	acgacgaccg	cgaccgtcct	ggcccaggc	60
ctggtccgcg	agggcctgcg	caacgttgcc	gccggtgcca	acccgatggc	gctgaagcgc	120
ggtatcgaga	aggccgtcga	gtccgtctcc	gccgcccgtc	tcgagcaggc	gaaggatgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ttccaccgccc	tccatctccg	ccgcccacac	ccagatcggt	240
gagctcatcg	ccgaggcgt	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggtctgga	gctggagctc	accgaggta	tgcgcttcga	caaggctac	360
atctcggcgt	acttcgcgac	cgacatggag	cgcatggagg	cggtcctgga	tgaccgtac	420
420 <210>	22 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. cinnamonensis	<400>	22
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggcgacggt	acgaccaccc	ccaccgtcct	ggcccaggc	60
ctcgtccgcg	agggcctgcg	caacgtggcc	gccggtgcca	acccgatggc	cctcaagcgt	120
ggtatcgaga	aggccgtcga	ggccgtctcc	gccgcccgtc	tcgcccaggc	caaggatgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ttccacggcc	tccatctccg	ccgcccacac	ccagatcggt	240
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggtctgga	gctggagctc	accgaggta	tgcgcttcga	caaggctac	360
atctcggcgt	acttcgccac	cgacatggag	cgcatggagt	cgtccctcga	cgaccgtac	420
420 <210>	23 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. cinereoruber	<400>	23
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacgga	acgaccaccc	cgaccgttct	cgcccaggc	60
ctggtccgcg	agggccttcg	caacgtcgcc	gccggcgcca	acccgatggc	tctgaagcgc	120
ggtatcgaga	aggccgtcga	ggccgtctcc	ggtgccctgc	tcgagcaggc	gaaggatgtc	180

gagaccaagg	agcagatcgc	ttcgacggcc	tccatctcg	ccgcccacac	ccagatcg	240									
gagctcatcg	ccgaggcgat	ggacaagg	tc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cg	tcgaggag	300							
tcccagac	ct	tcggtctg	ga	gctggaa	ctc	accgagg	ca	tgcgcttc	ga	caagg	ctac	360			
atctcg	cg	gt	acttgc	ccac	cgacatgg	gag	cgtatgg	agg	ccgt	cctc	ga	cgacccgt	ac	420	
420 <210>	24 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. cirratus <400>	24										
aagaagacgg	acgacgtcgc	gggcgacggt	acgaccac	ccaccgt	g	gcccagg	cg	60							
ctcg	tcg	aggc	c	caacgt	ggcc	gccggc	gcca	acc	cgat	ggc	c	cctaagg	cg	120	
gtatcg	aga	ggcc	gtc	ga	ggccgt	ctcc	gccg	cc	tcg	gc	caaggat	gtc	180		
gagaccaagg	agcagatcgc	ttcgacggcc	tccatctcg	ccgcccacac	ccagatcg	240									
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaagg	tc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cg	tcgaggag	300							
tcccagac	ct	tcggtctg	ga	gctcgag	ctc	accgagg	ca	tgcgcttc	ga	caagg	ctac	360			
atctcg	cg	gt	acttgc	ccac	cgacatgg	gag	cgtatgg	agg	cg	tcgctc	ga	cgacccgt	ac	420	
420 <210>	25 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. coeruleorubidus <400>	25										
aagaagacgg	acgacgtcgc	cgtgacggt	acgaccac	cgaccgtt	tct	cgcccagg	cc	60							
ctgg	taagg	aggc	ctg	caacgt	agcc	gccggc	gcca	acc	cgat	ggc	g	cctaagg	cg	120	
gtatcg	agc	gccc	gtc	ga	ggccgt	ctcc	gccg	cc	tg	gagc	agg	g	tcaggacgt	tc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccacggcc	tccatctcg	ccgcccacac	ccagatcg	240									
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaagg	tc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cg	tcgaggag	300							
tcccagac	ct	tcggtctg	ga	gctggag	ctc	accgagg	ta	tgcgcttc	ga	caagg	ctac	360			
atctcg	cg	gt	acttgc	cgac	cgacatgg	gag	cgtatgg	agg	cg	cctc	ga	cgacccgt	ac	420	
420 <210>	26 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. collinus <400>	26										

aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggt	acgaccaccg	cgaccgttct	cgtccaggcc	60
ctggtaagg	agggtctgct	caacgttagcc	gccggcgcca	acccgatggc	cctcaagcgc	120
ggtatcgagc	gtgccgtcga	ggccgtctcc	gccgccctgc	tggagcaggc	gaaggacgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccacggcc	tccatctccg	ccgcccacac	ccagatcgcc	240
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaaggc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccaacacct	tcggtctgga	gctggagctc	accgaggta	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctcgccgt	acttcgcccac	cgacatggag	cgtatggagg	ccgtcctcga	cgaccggta	420
420 <210>	27 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. corchorusii	<400>	27
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggt	acgaccaccg	cgaccgtgct	cgtccaggcc	60
ctggtaagg	aaggcctgct	caacgtcgcc	gccggcgcca	acccgatggc	tctgaagcgc	120
ggtatcgaga	aggccgtcga	ggccgtctcc	gccgccctgc	tggagcaggc	gaaggacgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccaccgca	tccatctccg	ccgcccacac	ccagatcgcc	240
gagctgatcg	ccgaggccat	ggacaaggc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccaacacct	tcggtcttga	gctggagctc	accgaggca	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctccgcct	acttcgcccac	cgacatggag	cgcattggagg	cggtgctgga	ggaccggta	420
420 <210>	28 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. diastaticus	<400>	28
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggt	acgaccaccg	cgaccgtcct	cgtccaggcc	60
ctcgccgtg	agggcctgct	caacgtggcc	gccggcgcca	acccgatggc	tctgaagcgc	120
ggcatcgaga	aggccgtcga	ggccgtctcc	ggcccccgtc	tgcgatggc	caaggacgtg	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccaccgca	tccatctccg	ccgcggacgt	ccagatcggt	240
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaaggc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300

tcccagacct	tcggctcgga	gctcgagctc	accgaaggca	tgcgcttcga	caagggtac	360
atctcgccgt	acttcgcccac	cgacatggag	cgtatggagg	cgtccctcgga	cgaccgtac	420
420 <210>	29 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. djakartensis	<400>	29
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggt	acgaccaccg	cgaccgtcct	cgtccaggcc	60
ctggtaaagg	aaggcctgcg	caacgtcgcc	gccggcgcca	acccgatggc	cctgaagcgc	120
ggtatcgagc	gcccgtcga	ggccgtctcc	gccggccctgc	tggagcaggc	gaaggacgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccacggcc	tccatctccg	ccgcccacac	ccagatcggc	240
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaaggc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggctcgga	gctggagctc	accgaggta	tgcgcttcga	caagggtac	360
atctcgccgt	acttcgcccac	cgacatggag	cgtatggagg	cgtccctcgga	cgaccgtac	420
420 <210>	30 <211>	423 <212>	DNA <213>	S. erumpens	<400>	30
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgaccaccg	cgaccgttct	ggcccaggcc	60
ctggtcacag	cggagggcct	gcaacgtc	gccggcgccg	ccaaccgat	ggccctgaag	120
cgcggtatcg	agaaggccgt	cgaggccgtc	tccggccccc	tgctcgagca	ggccaaggac	180
gtggagacca	aggaggagat	cgttccacc	gcctccatct	ccgcccggca	cacccagatc	240
ggcgagctga	tcgcccaggc	catggacaag	gtcgcaagg	aaggcgtcat	caccgtcgag	300
gagtcccaga	cttcggtct	ggagctggaa	ctcaccgagg	gtatgcgtt	cgacaaggcc	360
tacatctcg	cgtactttgc	caccgacatg	gagcgcattgg	aggccgcgtc	cgacgaccccg	420 tac
423 <210>	31 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. fulvissimus	<400>	31
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgacgaccg	cgaccgtcct	ggcccaggcc	60
ctcgtaaagg	aaggcctgcg	caacgtcgcc	gccggcgcca	acccgatggc	cctcaagcgc	120

ggcatcgaga	aggccgtcga	ggccgtctcc	ggcgccctgc	tcgagcaggc	caaggacgtg	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ttcgaccgcc	tccatctccg	ccgcccacac	ccagatcgcc	240
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcgcagacct	tcggtctgga	gctcgagctc	accgagggca	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctcggcgt	acttcgcccac	cgacatggag	cgtatggagg	cgtcgctcga	cgaccgtac	420
420 <210>	32 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. galilaeus <400>		32
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggt	acgaccaccg	cgaccgttct	cgcccaggcgc	60
ctggtccgcg	agggcctgcg	caacgtggcg	gccggcgcca	acccgatggc	tctgaagcgc	120
ggcatcgaga	aggccgtcga	ggccgtctcc	ggtgccctcc	tcgagcaggc	gaaggatgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ttcgacggcc	tccatctccg	ccgcccacac	ccagatcgcc	240
gagctcatcg	ccgaggcgat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	ggtcgaggag	300
tcgcagacct	tcggtctcga	gctcgagctc	accgagggca	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctcggcgt	acttcgacgac	cgacatggag	cgtatggagg	cgtcgctcga	cgaccgtac	420
420 <210>	33 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. griseochromogenes <400>		33
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgacgaccg	cgaccgttct	ggcccaggcc	60
ctggtcaagg	aaggcctccg	caacgtcgcc	gccggcgcca	acccgatggc	tctgaagcgc	120
ggtatcgaga	aggccgtcga	ggccgtctcc	gccggccctcc	tcgagcaggc	gaaggacgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccaccgcg	tccatctccg	ccgcccacac	ccagatcgcc	240
gagctgatcg	ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
agcaacacct	tcggtctgga	gctcgagctc	accgagggca	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctccgcct	acttcgacgac	cgacatggag	cgtatggagg	cgtcgctcga	cgaccgtac	420

420 <210>	34 <211>	420 <212>	DNA <213>	<i>S. griseolus</i> <400>	34
aagaagacgg acgacgtcgc cggcgacggt acgaccaccg ccaccgttct cgcccaggcg					60
ctcgtccgtg agggcctgcg caacgtcgcc gccggtgcca acccgatggc tctcaagcgt					120
ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc gccgcccgtc tggagcaggc caaggacgtg					180
gagaccaagg agcagatcgc ttcgaccgcc tccatctccg ccgcccacac cgagatcgcc					240
gccaagatcg ccgaggcgat ggacaagggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag					300
tcccagacct tcggtctgga gctggaaactc accgaggta tgcgcttcga caaggctac					360
atctcggcgt acttcgcccac cgacatggag cgtatggaga cgtcgctcga cgaccgtac					420
420 <210>	35 <211>	420 <212>	DNA <213>	<i>S. griseoviridis</i> <400>	35
aagaagacgg acgacgtcgc cgggtacggt acgaccaccg cgaccgtcct cgcccaggcc					60
ctggtaaagg agggcctgcg caacgtagcc gccggcgcca acccgatggc cctgaagcgc					120
ggtatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc gccgcccgtc tggagcaggc gaaggacgtc					180
gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgcccacac ccagatcgcc					240
gagctgatcg ccgaggccat ggacaagggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag					300
tcccagacct ttggtctgga gctggagctc accgaggta tgcgcttcga caaggctac					360
atctcggcgt acttcgcccac cgacatggag cgtatggagg cgtcgctcga cgaccgtac					420
420 <210>	36 <211>	420 <212>	DNA <213>	<i>S. humiferus</i> <400>	36
aagaagacgg acgacgtcgc cgggtacggt acgaccaccg cgaccgttct cgcccaggcc					60
ctggtaaagg aaggcctgcg caacgtcgcg gccggcgcca acccgatggc cctgaagcgc					120
ggtatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc gccgcccgtc tcgagcaggc caaggacgtc					180
gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tcgatctccg ccgcccacac ccagatcgcc					240

gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggctcgga	gctggagctc	accgagggta	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctcggcgt	acttcgcccac	cgacatggag	cgtatggagg	cgtcgctcga	cgaccctgac	420
420 <210>	37 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. hygroscopicus	<400>	37
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgacgaccg	cgaccgtcct	ggcccaggcc	60
ctggtccgcg	agggcctgcg	caacgtcgcc	gccggcgcca	acccgatggc	cctcaagcgc	120
ggtatcgagc	gtgcccgtcga	ggccgtctcc	gccggccctgc	tggagcaggc	caaggacgtg	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ttcgaccgcc	tccatctccg	ccgctgacac	ccagatcgcc	240
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggctcgga	gctggaaactc	accgagggta	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctcggcgt	acttcgcccac	cgacatggag	cgtatggagg	cgtcgctcga	cgaccctgac	420
420 <210>	38 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. minutiscleroticus	<400>	38
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgacgaccg	cgaccgtcct	ggcccaggccg	60
ctggtccgcg	agggcctgcg	caacgtcgcc	gccggcgcca	acccgatggc	cctgaagcgc	120
ggtatcgaga	aggccgtcga	ggccgtctcc	ggtgccctgc	tggagcaggc	gaaggacgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccacggcc	tccatctccg	ccgcccacgt	ccagatcgcc	240
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggctcgga	gctggagctc	accgagggta	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctcggcgt	acttcgcccac	cgacatggag	cgtatggagg	ccgtcctcga	cgaccctgac	420
420 <210>	39 <211>	423 <212>	DNA <213>	S. murinus	<400>	39 aagaagacgg
acgacgtcgc	cggtgacggt	acgaccaccg	cgaccgtcct	cgcccaggcc	60 ctggtcacag	

cggaaggcct	gwgcaacgtc	gccgcccgtg	ccaacccgat	ggccctgaag	120	cgcggtatcg
agaaggccgt	cgaggccgtc	tccgcccggcc	tgctcgagca	ggccaaggac	180	gtcgagacca
aggagcagat	cgcctccacc	gcgtccatct	ccgcccggca	cacccagatc	240	ggcgagctga
tcgcccgggc	gatggacaag	gtcggaagg	aaggcgtcat	caccgtcgag	300	gagagcaaca
ccttcggtct	ggagctttag	ctcaccgagg	gcatgcgtt	cgacaagggc	360	tacatcttcg
cctacttcgc	caccgacatg	gagcgcatgg	aggcgtcgct	cgacgaccgg	420	tac
423 <210>	40 <211>	420 <212>	DNA <213>	S. nodosus <400>	40	aagaagacgg
acgacgtcgc	cggtgacggt	acgaccacgg	cgaccgtgct	cgcccaggcg	60	ctggtccgcg
agggcctgcg	caacgtcgcc	gccggtgcca	acccgatggc	cctgaagcgc	120	ggtatcgaga
aggccgtcga	ggccgtctcc	accgcccgtc	tggagcaggc	gaaggacgtc	180	gagaccaagg
agcagatcgc	ctccacggcc	tccatctccg	ccgcccacac	ccagatcgcc	240	gagctgatcg
ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300	tcgcagacct
tcggtctcga	gctcgagctc	accgaggca	tgcgcttcga	caaggctac	360	atctcgccgt
acttcgcccac	cgacatggag	cgtatggagg	ccgtcctcga	cgaccgtac	420	
420 <210>	41 <211>	420 <212>	DNA <213>	R. equi <400>	41	aagaagacgg
acgacgtcgc	tggtgacggc	accacgacgg	ctacggtcct	ggctcaggcg	60	ctcgccg
agggcctgcg	caacgtcgct	gccggcgcca	acccgctggg	tctgaagcgc	120	ggcatcgaga
aggccgtcga	ggccgtcacc	gccaagctgc	tgcacaccgc	caaggaggtc	180	gagaccaagg
agcagatcgc	tgccaccgccc	ggatctcgg	cggcgactc	cacgatcgcc	240	gagctcatcg
ccgaggcgat	ggacaaggtc	ggcaaggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300	tcgaactcct
tcggcctgca	gctcgagctc	accgaggta	tgcgcttcga	caaggctac	360	atctcgctgt

acttcgcgac cgacgccc gag cgtcaggaag cggtcctcga ggatccgtac 420  
420 <210> 42 <211> 420 <212> DNA <213> T. paurometabola <400> 42  
aagaagaccg acgacgtcgc gggcgacggc accaccaccg ccaccgttct ggcggcaggcg 60  
ctcgtgcgca agggtctgcg caacatggct gcgggtgcga acccgctggg cctcaagcgg 120  
ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtgacc gagcacctgc tcaaggaggc caaggaggtc 180  
gagaccaagg agcagatcgc tgctaccgcg ggcatctcgg ccggcgaccc cgccatcggt 240  
gagctcatcg ccgaggccat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300  
agcaacacct tcggctcctca gctggagctc accgagggca tgcgcttcga caagggcttc 360  
atctccggct acttcgcccac cgacgccc gag cgtcaggagg ccgtgctcga ggacgcctac 420  
420